

Rec'd PCT/PTO 16 FEB 2005

PCT/JP 03/11080

25.09.03

#2

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 8月30日

出願番号
Application Number: 特願2002-254967
[ST. 10/C]: [JP 2002-254967]

出願人
Applicant(s): アンジェス エムジー株式会社

REC'D 17 OCT 2003

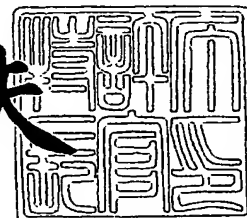
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P2002-02

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 48/00
C12N 15/63

【発明者】

 【住所又は居所】 三重県津市一身田上津部田 1 5 4 7 - 3 2

 【氏名】 珠玖 洋

【特許出願人】

 【識別番号】 500409323

 【氏名又は名称】 アンジェス エムジー株式会社

 【代表者】 村山 正憲

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 184182

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 制御性T細胞の活性を制御する方法および組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 CD4+CD25+制御性T細胞により認識される抗原を含む組成物。

【請求項 2】 CD4+CD25+制御性T細胞により認識される抗原がSEREX法により同定される分子である、請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】 CD4+CD25+制御性T細胞により認識される抗原をコードする発現ベクターを含む組成物。

【請求項 4】 CD4+CD25+制御性T細胞により認識される抗原がSEREX法により同定される分子である、請求項 3 記載の組成物。

【請求項 5】 SEREX法により同定される分子が自己抗原である、請求項 2 または 4 記載の組成物。

【請求項 6】 SEREX法により同定される分子が、DnaJ-like2(GenBank Accession No.: NM_005494, XM_028966, XM_172161, XM_052862, XM_062754, XM_093388, NM_016306, NM_012328, NM_005880)、ガレクチン[Galectin]8(GenBank Accession No.: AH008815, AF193806, AF193805)、ポリA結合タンパク質[PolyA binding protein](GenBank Accession No.: XM_067844)、リガーゼ[Ligase]1(GenBank Accession No.: NM_000234)から選ばれた 1 種である、請求項 2、4 または 5 記載の組成物。

【請求項 7】 遺伝子銃を用いて投与される、請求項 3 ないし 6 記載の組成物。

【請求項 8】 自己免疫疾患の予防及び／または治療のための請求項 1 ないし 7 記載の組成物。

【請求項 9】 アレルギー疾患の予防及び／または治療のための請求項 1 ないし 8 記載の組成物。

【請求項 10】 臓器または組織の移植において、拒絶反応及び／または移植片対宿主反応を抑制するための請求項 1 ないし 9 記載の組成物。

【請求項 11】 請求項 1 ないし 10 記載の組成物を哺乳動物へ投与することを含む、哺乳動物において免疫応答を抑制する方法。

【請求項 1 2】 請求項 1 ないし 1 0 記載の組成物を哺乳動物へ投与して哺乳動物において免疫応答を抑制し、さらにインターフェロン・ガンマを投与して該哺乳動物の免疫応答を回復せしめることを特徴とする、哺乳動物の免疫制御方法。

【請求項 1 3】 請求項 1 ないし 1 0 記載の組成物を哺乳動物へ投与して哺乳動物において免疫応答を抑制し、さらにインターロイキン12およびインターロイキン18を投与して該哺乳動物の免疫応答を回復せしめることを特徴とする、哺乳動物の免疫制御方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は生体内において免疫能の制御に関わる制御性T細胞の活性を制御する方法、特にその制御活性を有する組成物に関する。より詳細には、CD4+CD25+T細胞（制御性T細胞）をSEREX (serological identification of antigen by recombinant cDNA expression cloning) 法により見つけられた分子（SEREX抗原）で感作して制御性T細胞の活性を増強し、逆に活性化された制御性T細胞の活性をインターフェロン・ガンマの使用あるいはインターロイキン12とインターロイキン18との共用により減弱させることによる、制御性T細胞の活性の制御方法である。特に、制御性T細胞の活性を増強する組成物として、SEREX抗原をコードする発現ベクターを含むポリヌクレオチドが挙げられ、ポリヌクレオチド単独で、あるいは担体粒子等の上に固定されて細胞内に投与されるものである。

【0002】

【従来の技術】

ヒトは外来の異物を排除する生体防御機構が備わっていると同時に自己に対する寛容が成立しており、こうした免疫応答の誘起や制御はBリンパ球、Tリンパ球、抗体および抗原提示細胞（APC）の間の相互作用により行われる。まず、外来抗原はAPCによるプロセッシングを受け、主要組織適合複合体（MHC）クラスIおよびクラスII分子に結合され、ヘルパーT細胞に提示される。ヘルパーT細胞によりMHCに結合した外来抗原が認識されることにより、T細胞の活性化が起こり、サイ

トカインが分泌され、抗原で刺激されたB細胞が抗体産生細胞へと分化するのを助けると共に、キラーT細胞の分化も促す。分泌された抗体および活性化されたキラーT細胞により抗原を提示する細胞が排除され、外来抗原を排除する細胞性・体液性の反応が進行する。すなわち、T細胞が中心的な役割を果たして、標的となる抗原を認識し免疫応答が動員される。例えば、抗腫瘍免疫応答においても、CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞が極めて重要な役割を果たしていることが古くから知られている。(L.Gross, Cancer Res. 3: 326-333(1943); L.Old et al., Ann.N.Y.Acad.Sci. 101: 80-106(1962); R.J.North, Adv.Immunol. 35: 89-155(1984); P.D.Greenberg, Adv.Immunol. 49: 281-355(1991); D.M.Pardoll and S.L.Topalian, Curr.Opin.Immunol. 10: 588-594(1998))。CD8⁺CTL(cytotoxic T cell)は、生体内においても試験管内においても直接的に腫瘍細胞を破壊する能力を持つ主要なエフェクター細胞であるが、MHCクラスIに提示された抗原ペプチドの特異性に関して厳格であるのに対し、ナチュラルキラーT(NKT)細胞の場合は抗原特異性の制約が緩く、固有性の免疫応答を示すエフェクター細胞であると考えられている(M.J.Smyth et al., J.Exp.Med. 191: 661-668(2000); M.J.Smyth & D.I.Godfray, Nature Immunol. 1: 459-460; M.J.Smyth et al., Curr. Opin. Immunol. 14: 165-171(2002); T.Kawano et al., Proc.natl.Acad.Sci.USA 95: 5690-5693(1998))。一方、CD4⁺T細胞は直接には腫瘍細胞を破壊しないが、抗腫瘍免疫応答を複数の機構を通して制御する基本的な役割を担っているとされており(K.Hung et al., J.Exp.Med. 188: 2357-2368(1998); F.Ossendorp et al., J.Exp.Med. 187: 693-702(1998); D.M.Pardoll & S.L.Toplian, Curr.Opin.Immunol. 10: 588-594(1998); R.F.Wang, Trends. Immunol. 5: 269-276(2001))、MHCクラスII分子に提示された腫瘍抗原ペプチドを認識したCD4⁺ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞(APC)との相互作用によるCTLの活性化と増殖とを増幅する。これに対し、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞(Treg)は抗腫瘍免疫応答や種々の自己免疫病の進展を抑制するのに有効であることが示されてきた(E.M.Schvach, Annu.Rev.Immunol. 18: 423-449(2000); M.G.Roncarolo & M.K.Levings, Curr.Opin.Immunol. 12: 676-683(2000); J.Shimizu et al, J.Immunol. 163: 5211-5218 (1999); S.Sakaguchi et al, Immunol. Rev. 182: 18-32(2001))。しかしながら、Tregが

認識する自己抗原ペプチドはどんなものであり、抗原認識や機能におけるヘルパーT細胞との違いや関係は何であるかについては明らかにされていない (S. Sakaguchi, *Nature Immunol.* 2: 283-284(2001); K.J. Maloy & F. Powrie, *Nature Immunol.* 2: 816-822(2001); E.M. Shevach, *Nature Rev. Immunol.* 6: 389-400(2002))。

【0003】

CTLの定量的および定性的な増幅において、ヘルパーT細胞、CTLおよびAPC間の連続的な細胞間相互作用では、抗腫瘍免疫応答に関係するヘルパーT細胞が広い範囲の多様な抗原を認識する可能性が示唆されていた (J.P. Ridge et al., *Nature* 393: 474-478(1998); S.R.M. Bennett et al., *Nature* 393: 478-480(1998); S.P. Schoenberger et al., *Nature* 393: 480-483(1998); Z. Lu et al., *J. Exp. Med.* 191: 541-550(2000)) が、本発明者らは、CTL認識抗原とともにSEREX (serological identification of antigen by recombinant cDNA expression cloning) 抗原を投与することにより、極めて強力なCTL活性の増強、そして強力な腫瘍拒絶能を誘導することを見出した (H. Nishikawa et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 14571-14576(2001); 特願2001-191334号)。その結果、CD4⁺ヘルパー抗原、好ましくはSEREX法により見つけられた分子、および、CD8⁺CTLにより認識される抗原、好ましくは腫瘍抗原をコードする発現ベクターを含む組成物をポリヌクレオチドワクチンとして用いるという、腫瘍特異免疫を発現させるためのワクチンに関する発明に至った (特願2001-191334号)。

【0004】

CD4⁺CD25⁺T制御性細胞は機能的に成熟した状態で常時正常胸腺において産生されているが、通常はアナジーの状態にあり、T細胞リセプター (TCR) 刺激が入ると他のT細胞の活性化・増殖を強く抑制し、その際構成的に発現するCTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) 分子やGITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family) 分子を介した刺激伝達が抑制能発現に必要であることが明らかにされてきた (T. Takahashi et al., *J. Exp. Med.* 192: 303-310(2000); S. Read et al., *J. Exp. Med.* 192: 295-302(2000); J. Shimizu et al., *Nature Immunol.* 3: 135-142(2002))。TregはMHCクラスIIに結合した

自己抗原を認識する多くの特異性を持つ細胞から成り立っていると考えられているが、未だ抗原は同定されておらず、またTregの抑制能増強の機構については全く不明であった。

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

マウスやヒトなどの正常個体においては、外来の異物に対する生体防御機構としての免疫システムが備わっており、自己を攻撃することはない。この自己に対する寛容は、自己反応性免疫細胞の排除、自己反応性免疫細胞の不活化およびTregによる免疫抑制の3つの機構によるものと考えられている。そして、自己に対する寛容が破綻すると自己免疫疾患を発症する一方で、この自己寛容性が癌細胞の増殖を許している。また、臓器や組織の移植にあつては、外来抗原の排除機構が移植を困難なものとしている。こうした免疫システムにおいてTregが免疫制御に大きな役割を果たしていることが明らかになってきた現在にあつて、免疫異常による疾患、特に自己免疫疾患や移植拒絶反応、移植片対宿主反応、アレルギー疾患などに対して、Tregの活性を制御する方法および薬剤の開発が強く望まれる。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者は腫瘍抗原をコードする発現ベクターとSEREX抗原をコードする発現ベクターとを担癌マウスに投与してその抗腫瘍効果を検討する際に、SEREX抗原をコードする発現ベクターのみを投与すると、むしろ腫瘍組織の成長と転移の促進が観察されたことから本発明に到達した。

【0007】

本発明の目的は、制御性T細胞を人為的に抗原によって感作してその免疫抑制活性を増強することにより、移植における拒絶反応および移植片対宿主反応の抑制、自己免疫疾患の抑制およびアレルギー反応の抑制を実現することであり、これらの疾患あるいは病態を有する患者に対する有効な治療法を提供することにある。

【0008】

本発明は、免疫を抑制するための方法に関するものであり、CD4⁺CD25⁺T細胞により認識される抗原をコードする発現ベクターを投与することにより、免疫反応を抑制することが出来るという発見に基づくものである。従って、本発明はCD4⁺CD25⁺T細胞により認識される抗原またはそれをコードする発現ベクターを含む組成物に関する。より詳細には、CD4⁺CD25⁺T細胞により認識される抗原は好ましくはSEREX法により見つけられた分子であり、また抗原はヘテロ抗原であってもよいし自己抗原であってもよいが、自己抗原がより好ましい。SEREX法は、近年M.P freunds Schuhら (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94: 1914-1918(1997)) により開発された方法であり、ヒト血清を用いてヒト腫瘍のcDNA発現ライブラリーの検索を行うものであり、インターネットには、SEREX法により同定された遺伝子がSEREXデータベースとして1800種を超えて登録されている (www.licr.org/SEREX.html)。これらに限定されるわけではないが、例えば熱ショックタンパク質であるDnaJ-like2 (GenBank Accession No.: NM_005494, XM_028966, XM_172161, XM_052862, XM_062754, XM_093388, NM_016306, NM_012328, NM_005880)、ガレクチン[Galactin]8 (GenBank Accession No.: AH008815, AF193806, AF193805)、ポリA結合タンパク質[PolyA binding protein] (GenBank Accession No.: XM_067844)、リガーゼ[Ligase]1 (GenBank Accession No.: NM_000234)等を挙げることができる。本明細書中の「SEREX同定分子」とは、SEREX法により同定されたこれらの分子を意味する。

【0009】

本発明において抗原をコードするポリヌクレオチドは、本発明の方法により宿主動物に投与することにより所望の免疫応答を生じさせ得る限り、特に限定されるものではなく、DNAまたはRNAであり得る。本発明の抗原をコードするポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが所望の免疫応答を宿主において生じさせることができる限り、そのヌクレオチド配列が配列部位特異的変異誘発法等の公知の手法により (edit. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology(1987) John Wiley & Sons, Section 8.1-8.5 参照) 人工的に1以上のアミノ酸配列を欠失・置換・挿入・付加されたものでもよい。また、所望の免疫応答を宿主動物において生じさせ得る限り、自然界に存

在する変異体は、公知のハイブリダイゼーション技術(edit. Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology(1987) John Wiley & Sons, section 6.3-6.4参照)および遺伝子増幅技術(PCR)(edit. Ausbel et al., Current Protocols in Molecular Biology(1987) John Wiley & Sons, section 6.1-6.4参照)を利用して単離することもできる。

【0010】

また、抗原蛋白質をコードする遺伝子が知られている場合に、その蛋白質のアミノ酸配列上の疎水性／親水性領域を解析し(Kyte and Doolittle, J.Mol.Biol. 157: 105-122(1982))、二次構造を解析し(Chou and Fasman, Ann.Rev.Biochem. 47: 251-276(1978))アミノ酸配列中の抗原性領域を推定すること(例えば、Anal/Biochem. 151: 540-546(1985)参照)、そして、推定されたアミノ酸配列のペプチドを合成しその抗原性をPEPSCAN法(Nature 314(1985); 特表昭60-500684号公報)等により決定することは当業者が容易に行い得ることである。従って、前記方法に基づき決定されたエピトープ部分を含むペプチド断片をコードするポリヌクレオチドを化学合成等の手法により製造して本発明の抗原の発現ベクターとして用いることもできる。

【0011】

本発明において用いられる発現ベクターは、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞により認識される抗原遺伝子を組込んだ組換えベクターであり、抗原遺伝子を挿入するベクターとしてはプラスミド、ファージ、コスミド、ウイルス、及び、当分野において従来用いられているその他のベクターを例示することができる。当業者であれば、例えば、edit. Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.)、及び、edit. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987) John Wiley & Sons等に記載された技術により、様々なプラスミド及びベクターを構築することが可能である。

【0012】

ここで用いるプロモーター、ターミネーター等の宿主内における発現制御を行う因子は、当業者であれば宿主の種類及び目的に応じて公知の制御配列から適宜

選択し、抗原遺伝子の上流及び／または下流に配置することが可能である。従って、抗原由来の制御配列を用いてもよいし、異種の制御配列を用いることも可能である。また必要であれば、抗生物質耐性マーカー等のマーカーを本発明の発現ベクターの中で用いることも可能である。多数の市販のベクターを利用することができるが、本発明において必須ではないポリヌクレオチド配列を除去することが好ましい。

【0013】

本発明の組成物はnakedプラスミドとして使用でき、リポソーム内にパッケージングするか、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター及びHVJベクター等の各種ウイルスベクターとして形成するか(例えば、K. Adolph “ウイルスゲノム法” CRC Press, Florida (1996) 参照)、または、コロイド金粒子等のビーズ(担体)に被覆して用いることができる。これに限定されるわけではないが、好ましくは遺伝子銃等により生体内に導入される金粒子等の担体粒子上に、CD4+CD25+制御性T細胞により認識される抗原を発現させるベクターを付着させた形態のものである。ポリヌクレオチドで担体粒子をコートする技術は公知である(例えば、W093/17706参照)。最終的にポリヌクレオチドは、生体への投与に適する生理的食塩水等の溶液中に調整することができる。その他、プラスミドの細胞内取り込みの助けとなるカルシウムイオン等の薬剤を併用することも可能である。その他、必要に応じトランスフェクションを容易にする医薬的に許容される薬剤を合わせて用いることができる。

【0014】

本発明組成物は、いかなる方法により投与することもできるが、好ましくは、適当な非経口経路、例えば静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介して注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法(電子銃等による)、点鼻薬等の形態での粘膜経路を介する方法等により投与される。これらの投与方法うち、加速粒子による遺伝子形質転換技術は、米国特許第4,945,050号、第5,240,842号等にも記載されており、その改良法に基づく装置も市販されている(Biorad Laboratories)。

【0015】

本発明における宿主動物の種類も限定されないが、具体的には例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、猫、豚、ヒツジ、牛、馬、並びに、サル及びヒト等の霊長類を含む哺乳動物を挙げることができ、中でもヒトがより好ましい宿主動物である。

【発明の実施の形態】

本発明において用いられる抗原あるいは発現ベクターの投与量は、疾患の種類、程度、性別、年齢、体重、投与経路等によって異なり限定されないが、通常は一回あたり $0.001\mu\text{g}\sim 1\text{g}$ 、好ましくは $0.01\mu\text{g}\sim 10\text{mg}$ 、より好ましくは $0.1\mu\text{g}\sim 100\mu\text{g}$ を投与する。

【0016】

以上のようにして実施された結果として実現される免疫抑制状態はインターフェロン・ガンマの投与、あるいはインターロイキン12とインターロイキン18の併用投与によって解除される。すなわち、こうしたサイトカインの作用とSEREX抗原による感作とを適切に組み合わせることにより、制御性T細胞を人為的に操作することができ、自己免疫疾患、臓器移植に伴う反応、アレルギー反応および腫瘍免疫の制御等に適用することができる。

【0017】

さらに免疫抑制状態の解除は、抗CD4抗体、抗CD25抗体による処理によっても可能である。

【0018】

従って本発明は、制御性T細胞の活性を制御する方法および組成物を提供するものである。

【0019】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、該実施例は本発明をいかなる意味でも限定することを意図したものではない。

【0020】

参考例 SEREX抗原と腫瘍抗原との同時感作による肺転移の阻止

BALB/c起源の3-メチルコラントレン誘導肉腫CMS5m細胞は、in vivo注射の後、肺転移を起こし、動物を5～6週間以内に死に至らしめる。そこで、総量0.1mlの 1×10^6 CMS5m腫瘍細胞を側尾静脈よりBALB/cマウスへ投与し、肺転移についてのモデルとした。腫瘍抗原として変異キナーゼであるmERK2、SEREX抗原としてDnaJ-like2を用いた。1)mERK2をコードするプラスミド、2)mERK2プラスミドおよびコントロールベクターをコードするプラスミドの混合物、3)mERK2プラスミドおよびDnaJ-like2プラスミドの混合物、により腫瘍投与の14日前、7日前、腫瘍投与の日(同日)、または、腫瘍投与から5日後に隔週免疫化を開始した(H.Nishikawa et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98: 14571-14576(2001)に記載の方法による)。腫瘍投与から28日後にマウスを殺し、肺小瘤数を解剖顕微鏡で数えた。各グループについて5匹の動物を用い、結果はその平均 \pm SEMとして表した。

腫瘍投与を始める14日前にマウスをmERK2をコードするプラスミドで免疫化することにより肺転移を完全に予防することができた。この予防的な効果は、腫瘍投与の7日前に行った場合、または腫瘍投与後に行った場合には見られなかった(図5参照)。それに対して、mERK2プラスミドおよびDnaJ-like2プラスミドを組合わせての免疫化では、腫瘍投与から5日後までの免疫化でも転移が完全に予防された(図5参照)。転移の有無は組織病理学的試験により確認した。図中の数値は各グループについて5匹のマウスの平均 \pm SEMとして表される。

【0021】

実施例 1 SEREX抗原単独感作による肺転移の促進

参考例と同様の肺転移モデルにおいて、腫瘍投与の5日後にSEREX抗原をコードするプラスミドまたはコントロールベクターで免疫したマウスを腫瘍投与後28日目に殺し、肺小瘤数を数えた。SEREX抗原として熱ショックタンパク質DnaJ-like2、DNAリガーゼ1、ガレクチン8およびポリA結合タンパク質サイトプラスミックスの4種類(いずれもマウスのタンパク質)各々のプラスミドで免疫した場合は小瘤数は130-170であり、こうした免疫をしない場合には小瘤数は30-50であった。これに対し、SEREX分析を繰り返しても検出されなかったマウス分子3種、グルコース制御タンパク質、分泌ネクシンおよびTCP-1ゼータ1サブユニット(Cctz-1)含有シャペロンをコードするプラスミドで免疫した場合には、転移の促進は観

察されなかった(図1a、1b)。また、ヒトSEREX抗原3種類(Homo sapiens HMBA 誘導タンパク質、ヒトレチノイン酸応答タンパク質およびH. sapiens 肝炎デルタ 抗原反応タンパク質A)やオブアルブミンなど異種のタンパク質をコードする プラスミドで免疫しても転移の促進は観察されなかった(図1a)。すなわち、自己 抗原としてのSEREX抗原による単独感作が転移を促進していることが示唆された。

【0022】

そこで、この転移促進に関与している細胞表現型を解析した。マウスを抗CD4 モノクローン抗体や抗CD25モノクローン抗体で前処理しておく、DnaJ-like2感 作による転移促進は全くなかった(図2a、2b)。抗CD25モノクローン抗体によ る前処理のみの場合には、前処理もない場合に比べて転移小瘤はかなり減少した (図2b)。また、抗CD8モノクローン抗体で前処理しDnaJ-like2で感作した場合 は転移の促進が抗体前処理のない場合と同程度に観察された(図2c)。この結果 から、転移の促進はCD4⁺またはCD4⁺CD25⁺T細胞が担っていることが示された。

【0023】

実施例2 SEREX抗原で感作されたCD4⁺CD25⁺T細胞は肺転移を促進する

実施例1で得られた結果を直接的に確認するために、SEREX抗原で感作されたCD 4⁺CD25⁺T細胞を腫瘍接種マウスに移植して転移の促進の有無を調べた。すなわち 、DnaJ-like2抗原で免疫したマウスから腫瘍マウスにCD4⁺CD25⁺T細胞を移植した 場合には肺転移を著しく促進したが、CD4⁺CD25⁻T細胞を移植した場合には肺転移 の促進はほとんど観察されなかった。また、感作されていないCD4⁺CD25⁺T細胞を 移植した場合は、移植していない場合に比して有意な転移促進が観察されたが、 それは感作されたCD4⁺CD25⁺T細胞を移植した場合に比してずっと小さいものであ った(図3)。

【0024】

実施例3 SEREX抗原による前処理はCD8⁺T細胞ではなく、CD4⁺T細胞の活性を抑 える

本発明者らは先に、腫瘍接種マウスに各々腫瘍抗原およびSEREX抗原をコード するプラスミドを投与すると強力な抗腫瘍免疫応答を惹起できること、その際CD

4+T細胞のヘルパー機能が著しく増強され、CD8+T細胞応答増幅はCD4+T細胞に依存するものであることを報告した (H.Nishikawa et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U SA 98: 14571-14576 (2001); 特願 2001-191334号)。

【0025】

そこで、実施例2で確認した抗腫瘍免疫応答の抑制において、CD8+T細胞とCD4+T細胞の免疫応答性が変化しているか否かを調べた。腫瘍抗原として変異キナーゼであるERK2の9マーのペプチドmERK2 9m を用いた。マウスをDnaJ-like2で前免疫し、その上でmERK2 9m をコードするプラスミド単独、あるいはこれとDnaJ-like2をコードするプラスミドと併用で免疫して、ELISPOTアッセイによりmERK2 9m

特異的CD8+T細胞を分析した。mERK2 9m 単独の場合は、DnaJ-like2前処理がCD8+T細胞を変化させなかった (図4a) が、併用免疫の場合は、DnaJ-like2前処理がない時に観察されたヘルパー活性の増強がDnaJ-like2前処理により全く消滅してしまった (図4b)。この結果から、SEREX抗原で免疫すると、CD8+T細胞ではなく、CD4+T細胞のヘルパー活性が抑制されることが明らかになった。なお、 α -GalCer-CD1dテトラマーによる解析により、局所のナチュラルキラーT(NKT)細胞の細胞数減少が認められた。

【0026】

以上の実施例1、実施例2および実施例3により、マウス腫瘍転移モデルにおける抗腫瘍免疫応答を例として、SEREX抗原をコードするプラスミド単独による処理がCD4+CD25+制御性T細胞を活性化する結果としてCD4+ヘルパーT細胞の活性を抑制し、免疫応答全体を抑制することが実験的に証明された。

【0027】

【発明の効果】

以上のようにSEREX抗原が制御性T細胞の免疫抑制活性を促進することが明らかにされたことにより、制御性T細胞の活性を制御する方法が初めて示された。

【0028】

従来、自己免疫疾患やアレルギーの治療および移植拒絶や移植片対宿主反応を抑制する治療は様々な手法や薬剤が開発されているにもかかわらず有効性に限界があり、これらを超える有効性が求められている。

【0029】

本発明は近年生体内における重要性がますます明らかにされつつあるCD4⁺CD25⁺制御性T細胞の作用を制御する極めて有効な方法と組成物を提供するものであり、自己免疫疾患やアレルギー疾患の治療、臓器・組織移植に伴う療法に大きな進歩をもたらすものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

SEREX抗原単独による免疫化が肺転移を促進することを示すグラフである。

【図2】

SEREX抗原単独免疫化によって誘導された肺転移促進を担う細胞はCD4⁺またはCD4⁺CD25⁺細胞であり、CD8⁺細胞ではないことを示すグラフである。

【図3】

SEREX抗原単独免疫化マウスからのCD4⁺CD25⁺T細胞の移植により肺転移が促進されることを示すグラフである。

【図4】

SEREX抗原の単独前処理は、mERK2抗原に特異的なCD8⁺T細胞の数を抑制することを示すグラフである。

図中、9m-pulsed P1HTRはmERK2 9m抗原タンパクを、p63-71(T)-pulsed P1HTRは対照の抗原タンパクを意味する。

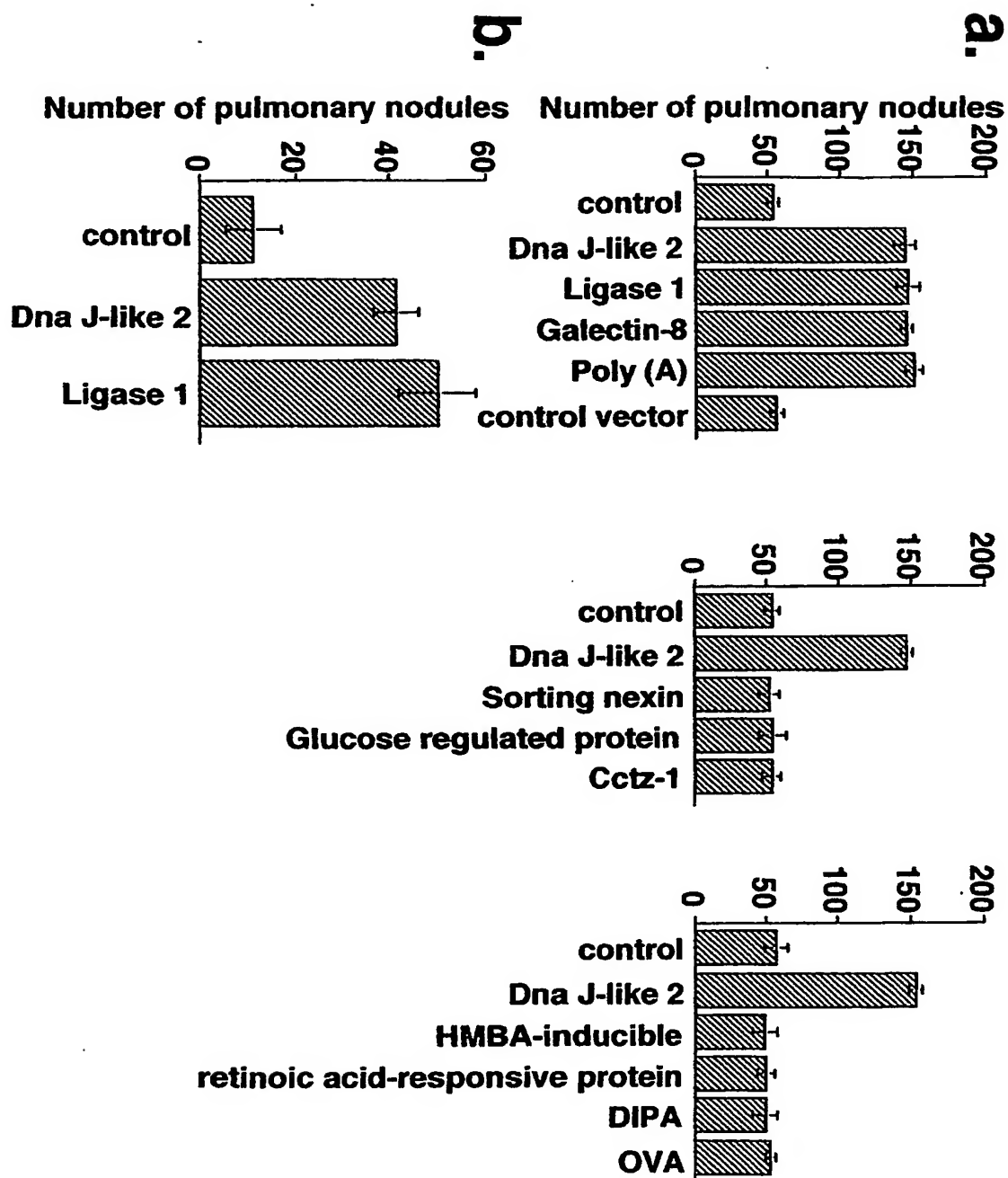
【図5】

mERK2または147HER2、及びDna J-like2を用いた免疫化による肺転移に対する*in vivo*の予防・治療効果を示すグラフである。

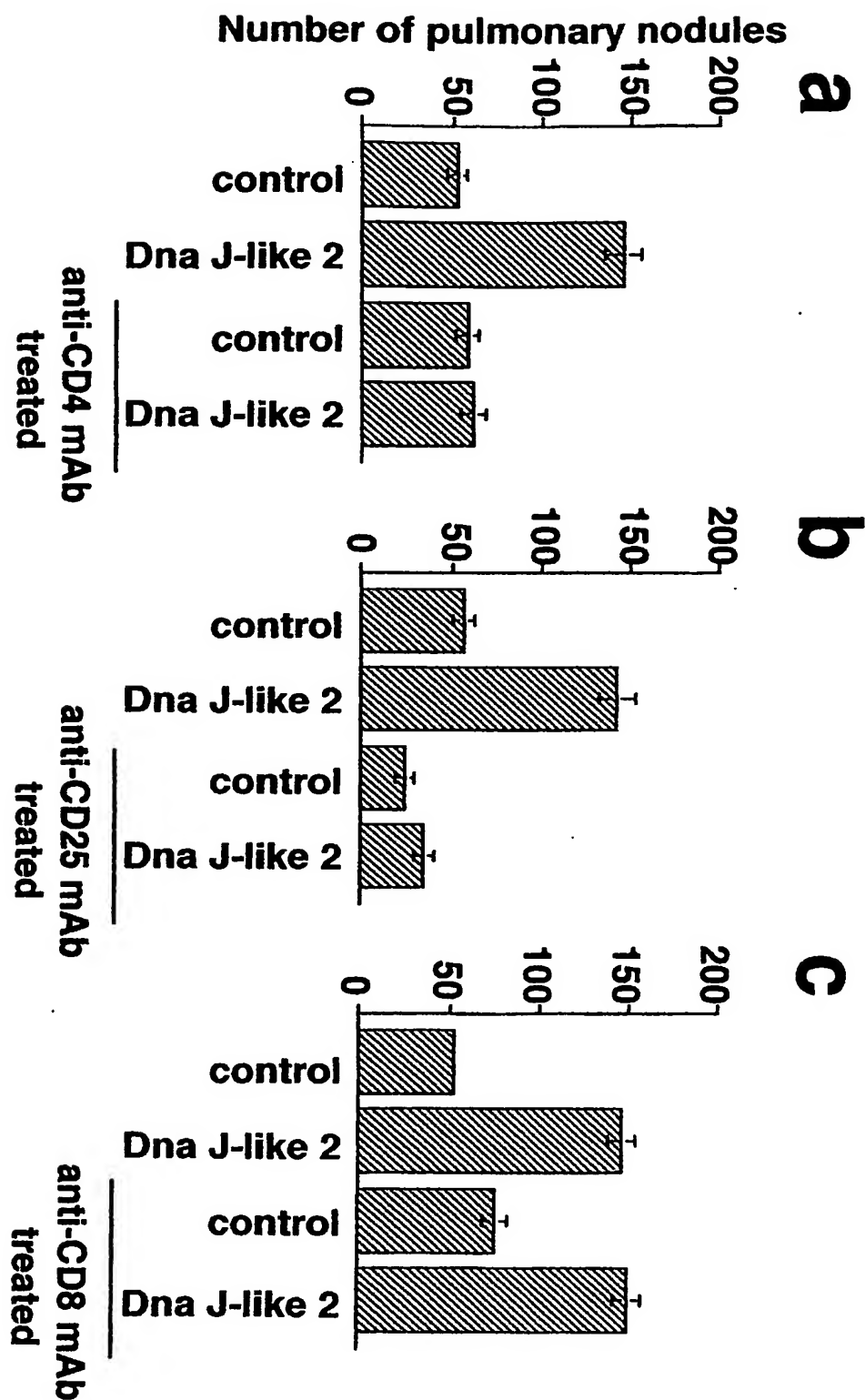
【書類名】

図面

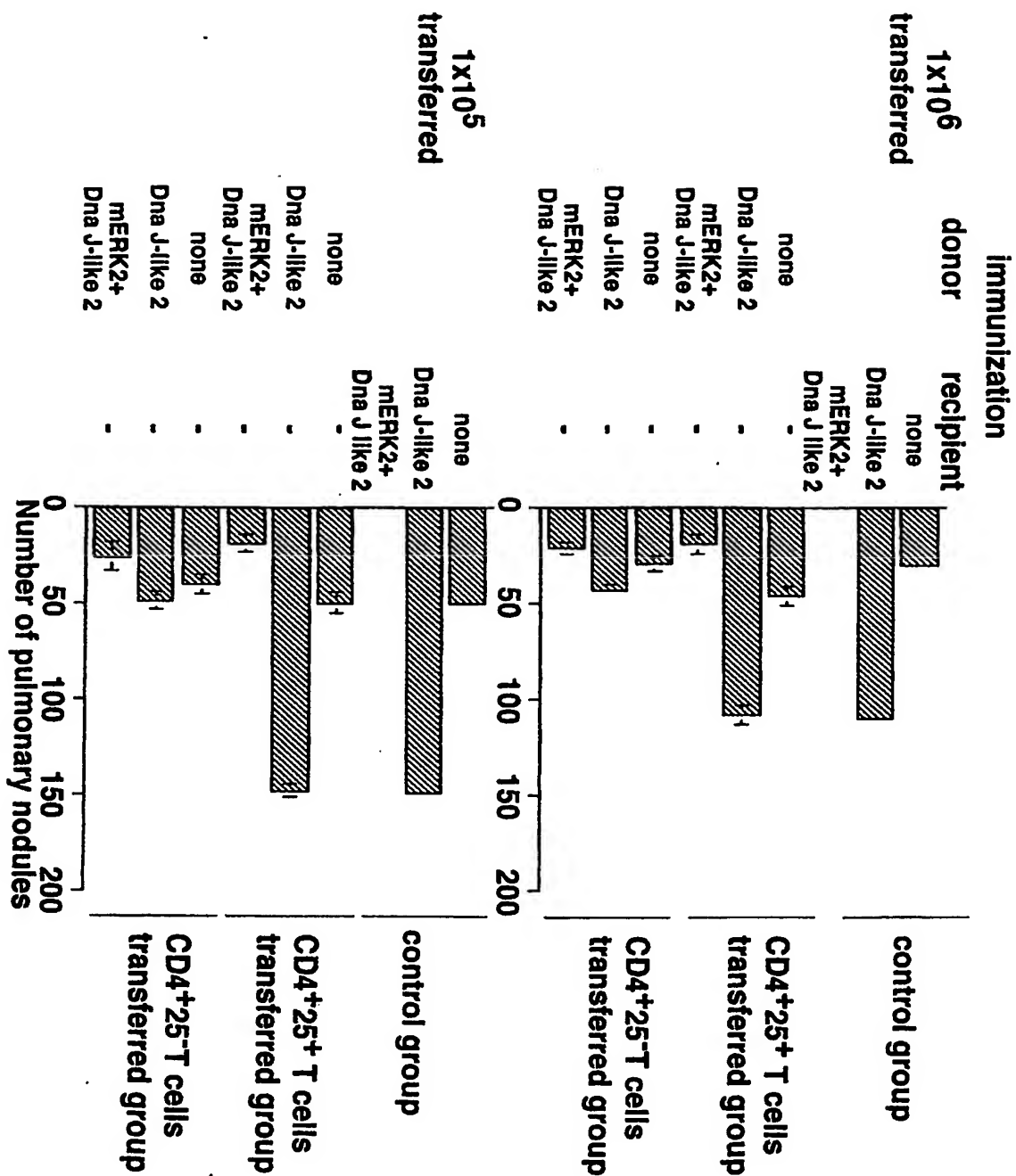
【図 1】



【図 2】

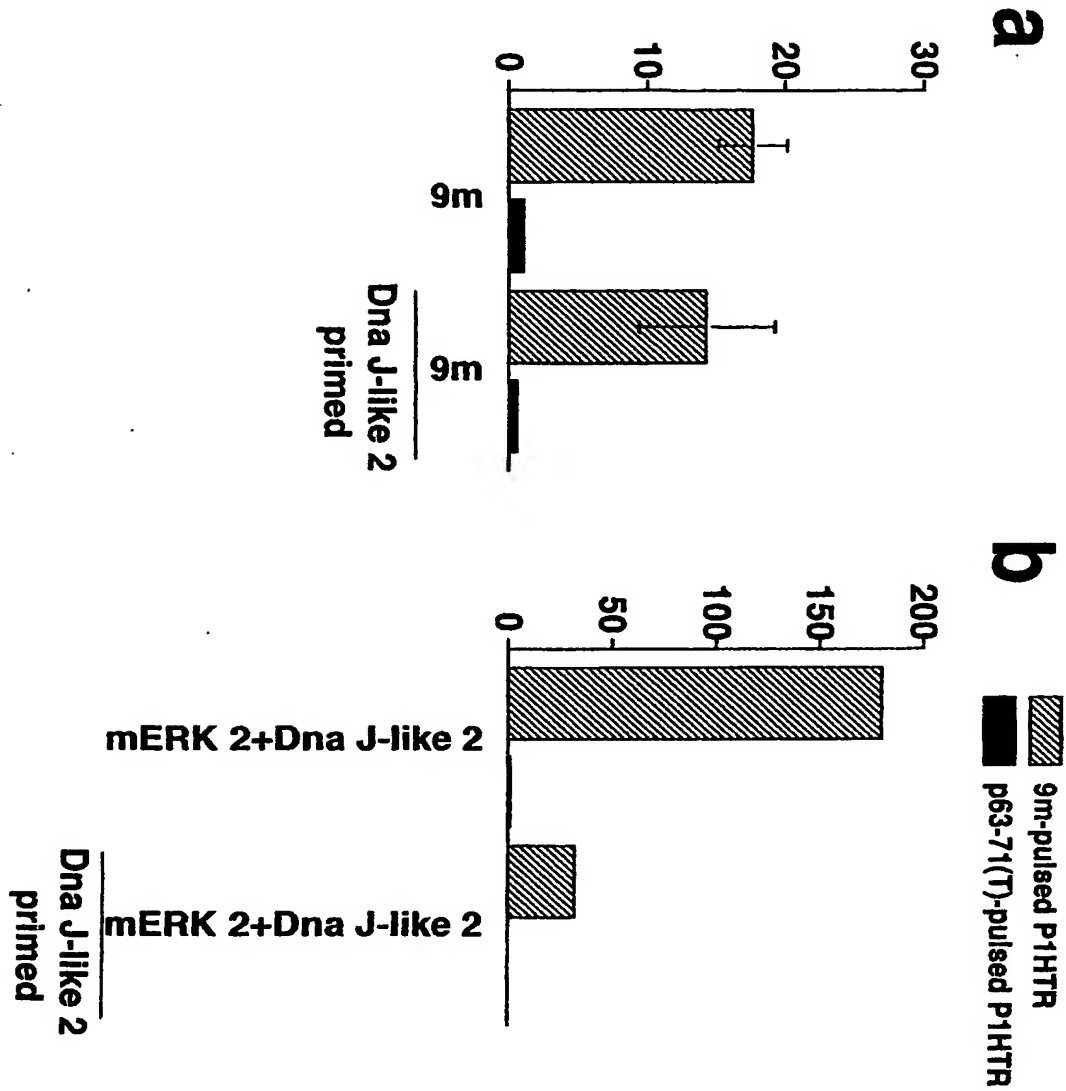


【図3】

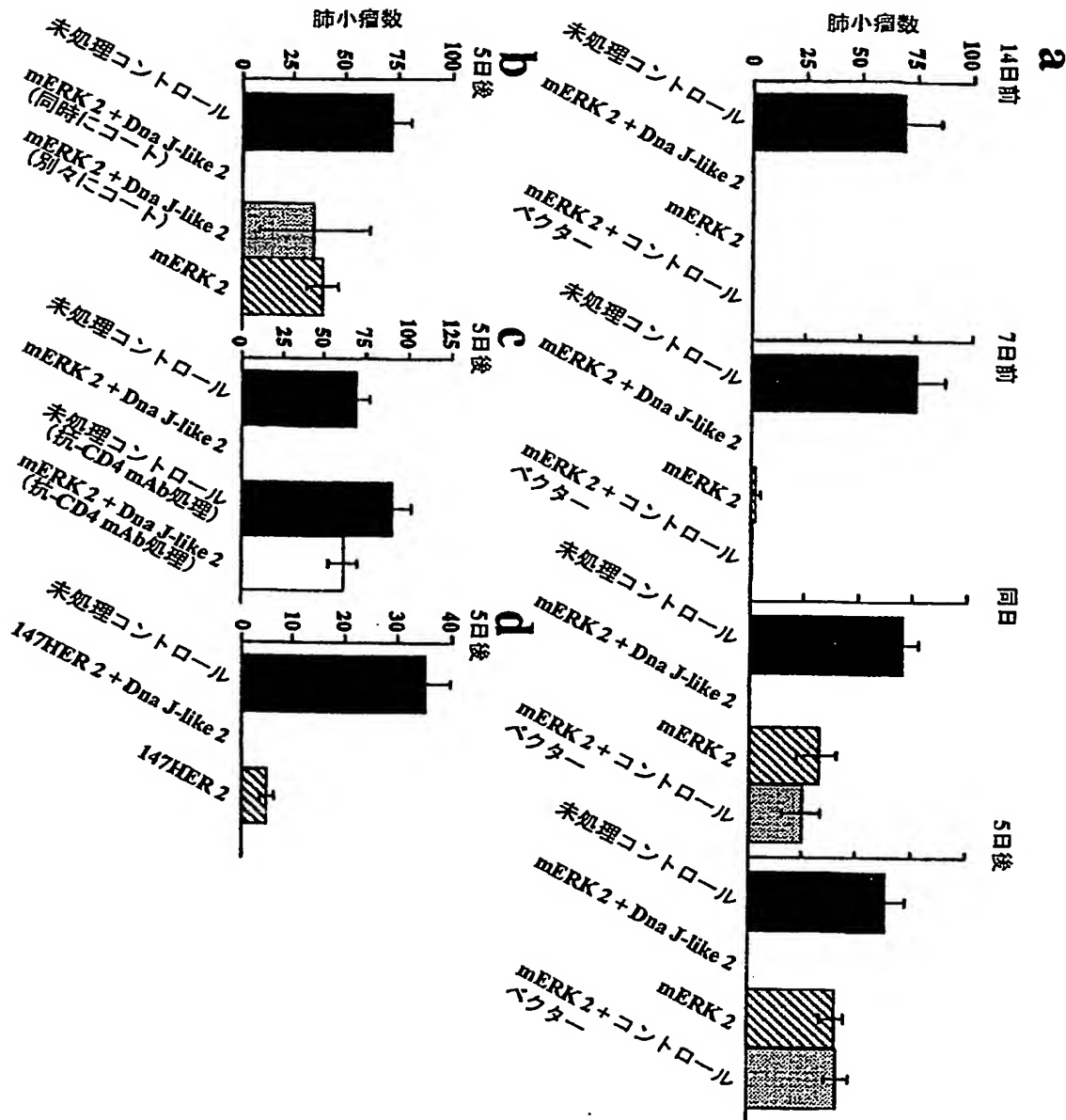


【図 4】

Number of IFN- γ secreting CD8⁺ T cells



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 制御性T細胞の活性を制御するための組成物および制御方法を提供する

。

【解決手段】 CD4+CD25+制御性T細胞が認識する抗原または抗原をコードする発現ベクターを含む組成物および該組成物を哺乳動物に投与して哺乳動物の免疫応答を制御する方法に関するものであり、自己免疫疾患およびアレルギー疾患の予防や治療、移植における拒絶反応や移植片対宿主反応の抑制に有用な手段を提供するものである。さらに免疫抑制状態はインターフェロン・ガンマの投与、あるいはインターロイキン12とインターロイキン18の併用投与によって解除される。すなわち、こうしたサイトカインの作用とSEREX抗原による感作とを適切に組み合わせることにより、制御性T細胞を人為的に操作することができ、自己免疫疾患、臓器移植に伴う反応、アレルギー反応および腫瘍免疫の制御等に適用することができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-254967
受付番号	50201300705
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 9月 2日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 8月30日
-------	-------------

次頁無

特願 2002-254967

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[500409323]

1. 変更年月日
[変更理由]

2001年12月 6日

名称変更

住所変更

住 所
氏 名

大阪府豊中市新千里東町1丁目四番二号
アンジェス エムジー株式会社